

天山花楸化学成分的液质联用分析

郁长治,郭小娜* (新疆医科大学第一附属医院,新疆乌鲁木齐 830054)

摘要 [目的]采用高效液相色谱-电喷雾质谱联用技术识别天山花楸总黄酮类中的化学成分。[方法]反相 C18 色谱柱,以乙腈-0.3% 甲酸为流动相,检测波长 360 nm,梯度洗脱。利用紫检测器和电喷雾质谱负离子模式在线检测化学成分,扫描范围 250~700 amu。通过此方法分析糖苷及其苷元。[结果]通过标准品对比及解析质谱,识别了 7 个化合物,分别为绿原酸、芦丁、金丝桃苷、槲皮素 3-O-己糖苷、槲皮素 3-O-己糖苷丙二酸复合物、山奈素 3-O-己糖苷、山奈素 3-O-己糖苷丙二酸复合物。[结论]HPLC/ESI-MS² 技术可准确迅速识别天山花楸黄酮类化合物,方法稳定可靠。

关键词 天山花楸;黄酮化合物;液质谱联用
中图分类号 R284.1 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2017)05-0111-03

Analysis of Chemical Compositions in *Sorbus tianshanica* Rupr by HPLC-ESI-MS

YU Chang-zhi, GUO Xiao-na* (The First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi, Xinjiang 830054)

Abstract [Objective] To analyze and identify the chemical compositions form total flavonoids of *Sorbus tianshanica* Rupr by HPLC-ESI-MS. [Method] The analysis was processed by means of a reversed phase C18 column and binary mobile phase system consisting of acetonitrile-0.3% methanoic acid records 360 um by ultraviolet detector. The electrospray ionization mass spectrometry under negative ion modes was used to detect the chemical constituents. The full scan of ions ranged from 250-700 amu. Glycosides and aglycones were analyzed. [Result] 7 compounds were identified by standard comparison and analytical mass spectrometry, including 3-caffeoylquinic acid, rutin, hyperin, quercetin3-O-hexoside, quercetin glycoside 3-O- hexose malonic acid compound, kaempferol hexoside 3-O-hexoside, kaempferol glycosides 3-O-hexose malonic acid compound. [Conclusion] HPLC-ESI-MS can accurately and quickly identify the compositions of flavonoids in *S. tianshanica*, the method is stable and reliable.

Key words *Sorbus tianshanica* Rup;Flavonoids;HPLC/ESI-MS

天山花楸(*Sorbus tianshanica* Rup)为花楸属蔷薇科植物^[1],具有悠久的民间用药历史^[2],具有改善心脑血管、降低血管阻力、依赖性地抑制心肌收缩和保护心肌缺血等^[3]重要作用,在机体抗氧化^[4-5]、镇咳平喘方面也有显著的效果。研究表明,天山花楸中主要化学成分有黄酮、甾醇、三萜等化合物^[6]。目前,对天山花楸黄酮的测定方法主要有薄层色谱法、紫外分光光度法、毛细管电泳法和高效液相法^[7-8],但这些方法无法对提取物中的未知化合物进行定性分析。近年来,多级质谱联用技术广泛应用于天然化合物的定性、定量分析^[9],可以快速确定未知成分^[10]。笔者采用 HPLC/ESI-MS² 技术对天山花楸总提取物进行了分析,为明确天山花楸化合物组成提供了试验基础和依据。

1 材料与方法

1.1 试材 天山花楸提取物(自制);芦丁、绿原酸、金丝桃苷、槲皮素、异鼠李素、山奈素标准品(中国药品生物制品检定所);乙腈、甲酸(色谱纯);高纯水。

1.2 仪器 岛津 LC-20AD 高效液相色谱仪,色谱柱 waters C18(4.6 mm×250 mm);质谱仪 AB/applied Biosystem. API4000,Analyst 1.42 数据处理系统。

1.3 方法

1.3.1 样品溶液制备。称取天山花楸 1 000 g,经 60% 乙醇超声循环提取 2 次,浓缩后经 AB-8 大孔吸附树脂柱用 60% 乙醇洗脱,冷冻干燥得粉末 74 g。称取天山花楸提取物 10 mg,甲醇定容至 25 mL 容量瓶中,过 0.22 μm 微孔滤膜备

用。标准品均用甲醇溶解,用 0.22 μm 滤膜过滤。

1.3.2 色谱条件。梯度洗脱检测波长 360 nm;柱温 25 ℃;流速 1.0 mL/min;进样量 10 μL。梯度洗脱条件见表 1。

表 1 黄酮苷梯度洗脱条件

Table 1 Gradient elution conditions of flavonoid glycosides			
洗脱时间 Elution time min	0.3% 甲酸 0.3% formic acid %	乙腈 Methyl cyanide %	流速 Flow rate mL/min
0	86	14	1.0
10	76	24	1.0
20	65	35	1.0

1.3.3 质谱条件。采用 ESI 负离子扫描,扫描范围为 250~700 amu;碰撞气流速 5 psi,气常流速 20 psi,离子源电喷雾电压为-4 500 V,离子源温度 650 ℃,雾化气电流 GS1 50 psi、GS2 60 psi,去簇电压 DP 为-40 V、EP 为-50 V,碰撞能量为-35 V,碰撞出口电压为-6 V。使用气体为 N₂。

1.3.4 苷元分析。天山花楸提取物在酸性条件下加热水解。苷元经 HPLC/ESI-MS² 分析确定苷元类型。苷元的 HPLC 洗脱条件见表 2。

表 2 黄酮苷元梯度洗脱条件

Table 2 Gradient elution conditions of flavonoid aglycones			
洗脱时间 Elution time min	0.3% 甲酸 0.3% formic acid %	乙腈 Methyl cyanide %	流速 Flow rate mL/min
0	75	25	1.0
10	65	35	1.0
18	45	55	1.0
25	45	55	1.0

作者简介 郁长治(1985—),男,新疆乌鲁木齐人,药师,硕士,从事药物分析研究。* 通讯作者,药师,硕士,从事药物分析及新剂型研究。
收稿日期 2016-12-13

2 结果与分析

2.1 苷元分析 由苷元 HPLC 图(图 1)中样品的保留时间

可看出主要为 2 种苷元,通过 HPLC/ESI-MS² 并结合标准品比对(表 3)可以确定 2 种苷元是槲皮素和山奈素。

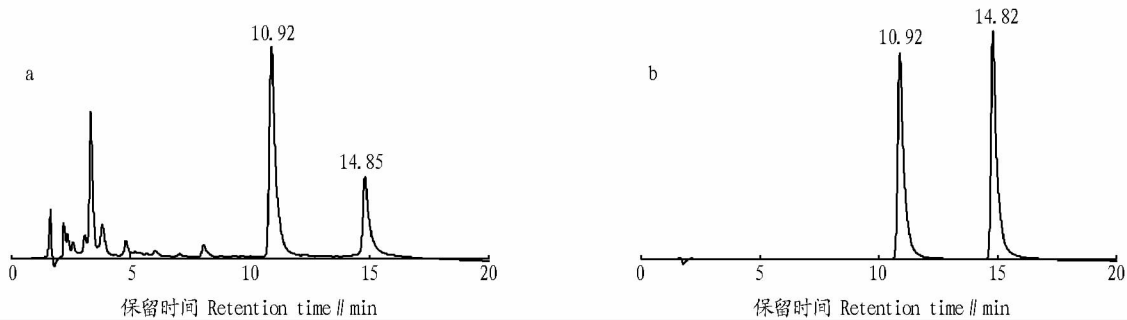


图 1 黄酮苷元(a)及其标准品(b)色谱

Fig. 1 Flavonoid aglycones(a)and their standard products(b)chromatograph

表 3 苷元标准品与样品数据对比

Table 3 Comparison of aglycone standard and sample data

标准品 Standard products	标准品分子量 Standard molecular weight	样品 Sample [M-H] ⁻ (m/z)	标准品保留时间 Standard retention time//min	样品保留时间 Sample retention time//min
槲皮素 Quercetin	303.24	300.8	10.92	10.92
山奈素 Kaempferide	286.23	284.8	14.82	14.85

2.2 总离子流与色谱分析 天山花楸提取物 HPLC 色谱图与其总离子流色谱图吻合(图 2)。因黄酮类化合物具有较

多羟基,可形成稳定的氧负离子,所以采用负离子检测模式,使总离子流色谱图有较低的信噪比。

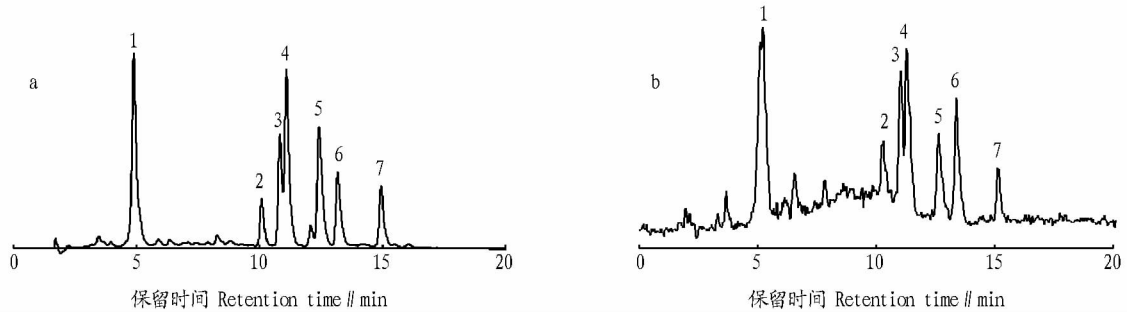


图 2 天山花楸黄酮液质联用色谱(a)和总离子流(b)

Fig. 2 HPLC-ESI-MS(a)and total ion current (b)of flavonoids in *S. tianshanica*

2.3 质谱解析

2.3.1 化合物 1。准分子离子峰 m/z 为 352.8 $[M-H]^-$,针对 m/z 352.8 进行二级质谱扫描,出现 m/z 190.9、160.8 碎片离子,发现其与绿原酸的 $[M-H]^-$ 离子碎片的分子量十分吻合。2 个离子碎片分别是绿原酸酯键断裂后形成的阿魏酸 m/z 190.9 和奎宁酸 m/z 160.8 的离子碎片(表 4)。最后通过标准品对比确定化合物 1 为绿原酸。

2.3.2 化合物 2。准分子离子峰 m/z 为 609.1 $[M-H]^-$,对 m/z 609.1 进行二级质谱扫描,出现 m/z 300.0 特征峰,并含有 m/z 273.0、178.9、151.0 特征碎片,可以认定这个是槲皮素离子,说明化合物 2 是以槲皮素为苷元的化合物。 m/z 307.4 离子碎片为槲皮素上的二糖结构(表 4)。对比分子量、苷元与糖苷的组成发现,此化合物与芦丁裂解规律一致。最后通过芦丁对照品对比确定化合物 2 为芦丁。

2.3.3 化合物 3。准分子离子峰 m/z 为 462.9 $[M-H]^-$ 。针对 m/z 462.9 进行二级质谱扫描,出现 m/z 300.8 特征峰,

并且含有 m/z 272.9、179.0、150.9 特征碎片,参考化合物 2 可以断定 m/z 300.8 是槲皮素离子; m/z 162.7 离子碎片与六碳糖苷的分子量吻合(表 4)。经对比分子量、苷元与糖苷的分子量与组成发现,此化合物与金丝桃苷的裂解规律十分吻合。最后通过金丝桃苷对照品对比,确定化合物 3 为金丝桃苷。

2.3.4 化合物 4。准分子离子峰 m/z 为 463.1 $[M-H]^-$ 。针对 m/z 463.1 进行二级质谱扫描,得到 m/z 300.0 特征峰,并且含有 m/z 273.0、179.0、150.8 特征碎片,同化合物 2 可以断定 m/z 300.0 是槲皮素离子,说明化合物 4 是以槲皮素为苷元的化合物。 m/z 155.0 离子峰的出现说明槲皮素苷元是按照 RDA 途径 I 进行裂解,可以推断 m/z 161 这个糖基是连接在槲皮素碳 3 位上(表 4)。所以此化合物可以认为是槲皮素 3-O-己糖苷。

2.3.5 化合物 5。准分子离子峰 m/z 为 549.0 $[M-H]^-$ 。针对 m/z 549.0 进行二级质谱扫描,同样得到了 m/z 300.0

的特征峰,并且含有 m/z 271.0、179.0、150.6 特征碎片,参考化合物 2 说明化合物 5 是以槲皮素为苷元的化合物;虽然未出现 m/z 155.0、136.0 等离子碎片,但按照槲皮素苷元与糖的连接特点可以认为糖的连接位置依然是槲皮素碳 3 位上。 m/z 160.8 为己糖离子。 m/z 89.0 为丙二酸的离子碎片,有文献报道黄酮苷在进行质谱解析中会出现含有丙二酸的结构成分(表 4)。所以此化合物推测是槲皮素 3-O-己糖苷丙二酸复合物^[11]。

2.3.6 化合物 6。准分子离子峰 m/z 为 447.0 $[M-H]^-$ 。针对 m/z 447.0 通过二级质谱扫描,得到 m/z 283.8 特征峰,

并且找到了山奈素 0、4 位裂解的特征碎片 m/z 177.8。由此可以断定 m/z 283.8 是山奈素离子,说明化合物 6 是以山奈素为苷元的化合物。 m/z 160.8 为己糖离子(表 4)。所以此化合物可以认为是山奈素 3-O-己糖苷^[12]。

2.3.7 化合物 7。准分子离子峰 m/z 为 533.2 $[M-H]^-$ 。针对 m/z 533.2 通过二级质谱扫描,出现 m/z 285.0、179.0,同化合物 6 可以断定 m/z 285.0 是山奈素离子,该化合物是以山奈素为苷元的化合物。 m/z 160.8 为己糖离子, m/z 89.0 为丙二酸(表 4)。所以此化合物可以推测是山奈素 3-O-己糖苷丙二酸复合物^[13]。

表 4 HPLC 分离化合物的质谱数据
Table 4 Mass spectrometric data of HPLC separated compounds

峰号 Peak No.	保留时间 Retention time//min	分子量 Molecular weight	$[M-H]^-$ (m/z)	MS/MS (m/z)
1	5.19	354.3	352.8	335.2、299.8、190.8、182.9、178.9、170.8、160.8、150.9、134.8、110.8
2	10.03	610.5	609.1	591.1、446.2、325.0、307.4、300.0、273.0、178.9、155.8、124.8
3	11.00	464.2	462.9	444.7、300.8、283.1、272.9、178.9、162.7、157.2、150.9、
4	11.25	463.9	462.9	445.1、300.0、307.0、300.0、270.9、179.0、173.1、161.1、155.0、150.8
5	12.63	550.3	549.3	505.2、462.9、300.0、271.0、179.0、160.8、150.6、97
6	13.36	448.0	447.0	283.8、269.0、254.9、225.0、160.8、130.6、101.1、61.8
7	15.15	534.2	533.2	489.1、447.3、285.0、191.2、179.0、162.7

3 结论

运用 HPLC/ESI-MS² 对天山花楸粗提物中的化学成分进行了系统研究,对天山花楸提取物在负离子模式下的离子流图中的化学成分进行了分析。结果表明,天山花楸化学成分主要为黄酮类化合物。根据不同化合物在质谱中的相对分子量、质谱碎片结构信息及色谱保留规律并加以标准品比对,成功鉴定了天山花楸中 7 个化合物,分别为绿原酸、芦丁、金丝桃苷、槲皮素 3-O-己糖苷、槲皮素 3-O-己糖苷丙二酸复合物、山奈素 3-O-己糖苷、山奈素 3-O-己糖苷丙二酸复合物。

参考文献

[1] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草:第 4 卷[M]. 上海:上海科学技术出版社,1999:292.
[2] 新疆维吾尔自治区卫生厅. 新疆维吾尔自治区卫生标准[S]. 乌鲁木齐:新疆卫生出版社,1987:1410.
[3] 付伟,刘婷,杨彩玉,等. 天山花楸叶总黄酮对大鼠心肌缺血/再灌注损伤的保护作用[J]. 中国药理学通报,2010,26(2):251-254.
[4] TERMENTZI A,KEFALAS P,KOKKALOU E. Antioxidant activities of various extracts and fractions of *Sorbus domestica* fruits at different maturity stages[J]. Food chemistry,2006,98(4):599-608.

[5] NA M K,AN R B,MIN B S,et al. Antioxidant compounds from the stem bark of *Sorbus commixta*[J]. Nat Prod Sci,2002,8(1):26-29.
[6] LI L,TANG H,WU T,et al. Chemical composition of *Sorbus tianschanica* leaves[J]. Chem of Nat Compd,2010,46(5):811-812.
[7] 马晓丽,常军民,李毓斌,等. 毛细管电泳法测定天山花楸中的黄酮类化合物[J]. 中成药,2011,33(3):534-536.
[8] MA Y C,LUO M,SARAH W,et al. Qualitative and quantitative evaluation of epimedium and ginseng contained combinations using HPLC[J]. Journal of Chinese pharmaceutical sciences,2003,12(1):6-10.
[9] TIAN H Z,WANG H,GUAN Y F. Separation and identification of isoflavonoids in *Pueraria lobata* extracts and its preparations by reversed-phase capillary liquid chromatography coupled with electrospray ionization quadrupole time of flight mass spectrometry[J]. Chinese journal of chromatography,2005,23(5):477-481.
[10] 肖崇厚. 中药化学[M]. 上海:上海科学技术出版社,1998:265-323.
[11] KAMATA K,SEO S,NAKAJIMA J. Constituents from leaves of *Apocynum venetum* L. [J]. J Nat Med,2008,62(2):160-163.
[12] NGUELEFACK T B,MBAKAM F H K,TAPONDJOU L A,et al. A dimeric triterpenoid glycoside and flavonoid glycosides with free radical-scavenging activity isolated from *Rubus rigidus* var. *camerunensis*[J]. Arch Pharmacol Res,2011,34(4):543-550.
[13] WALD B,WRAY V,GALENSA R,et al. Malonated flavonol glycosides and 3,5-dicaffeoylquinic acid from pears [J]. Phytochemistry,1989,28(2):663-664.

(上接第 58 页)

[15] 刘建军,何中虎,赵振东,等. 小麦品质性状与干白面条品质参数关系的研究[J]. 作物学报,2002,28(6):738-742.
[16] 宋建民,刘爱峰,吴祥云,等. 高分子量谷蛋白亚基组成及其含量与小麦品质关系研究[J]. 中国农业科学,2003,36(2):128-133.
[17] PAYNE P I. Genetics of wheat storage proteins and the effect of allelic variation on bread-making quality[J]. Annual review of plant physiology,1987,38:141-153.
[18] 刘丽,周阳,何中虎,等. 高低分子量麦谷蛋白亚基等位变异对小麦加

工品质性状的影响[J]. 中国农业科学,2004,37(1):8-14.
[19] 侯志强,吴昆伦,邓晓青,等. 青稞高分子量麦谷蛋白亚基 SDS-PAGE 分析[J]. 云南农业大学学报,2012,27(2):145-149.
[20] 张梅姐,张怀刚,蔡联炳,等. 野生大麦与青稞高分子量谷蛋白亚基遗传变异研究[J]. 西北农业学报,2007,16(1):107-110.
[21] 孟凡磊. 西藏青稞品种的遗传多样性分析及其改良[D]. 杨凌:西北农林科技大学,2008:15-23.
[22] 李涛. 青稞蛋白质的提取及其特性研究[D]. 郑州:河南工业大学,2012:26-27.